

저등급 표재성 방광암의 재발에서 Matrix Metalloproteinase 발현의 분석

Analysis of Matrix Metalloproteinase Expression in the Recurrence of Superficial Low Grade Urothelial Bladder Cancer

Young Deuk Choi, Hyun Soo Ahn¹, Nam Hoon Cho², Mee Kyung Lee, Sook Hee Kang², Won Jae Yang

From the Department of Urology, Urological Science Institute and ²Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, and ¹Department of Urology, Ajou University College of Medicine, Suwon, Korea

Purpose: Superficial bladder transitional cell carcinomas (TCCa) have high recurrence rates following endoscopic resection. Most of the parameters used for the prediction of a recurrence are associated with high grade TCCa. However, there are few valid parameters for prediction of the recurrence of low grade TCCa. We aimed to elucidate the prime factor of a recurrence of superficial low grade bladder TCCa.

Materials and Methods: Thirty cases of superficial low grade bladder TCCa were analyzed, 15 of which were recurred cases. Fresh frozen tumor and normal tissues were used for the analysis. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blots analyses were subsequently performed to evaluate the validity of the molecules identified by a 0.12K cDNA array, including matrix metalloproteinase (MMP), oncogenes and cell-cycle-related genes.

Results: On cDNA microarray analysis, MMP-1, 2, 9, 12 and 15, and transforming growth factor β 1 (TGF β 1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and fos were found to be significantly upregulated in the recurred cases. From the real-time RT-PCR for the validation of those molecules, MMP-1 and 12, and TGF β 1, VEGF and fos were significantly overexpressed in the recurred cases. Western blot showed significant overexpression of MMP-1 and 12, and TGF β 1, VEGF and fos in the recurred cases.

Conclusions: The overexpressions of MMP-1 and 12, and TGF β 1, VEGF and fos may be associated with the recurrence of superficial low grade bladder TCCa. (Korean J Urol 2005;46:327-335)

Key Words: Bladder tumor, Superficial, Recurrence, RT-PCR, Matrix metalloproteinases

대한비뇨기과학회지
제 46 권 제 4 호 2005

연세대학교 의과대학
비뇨기과학교실, 비뇨의과학연구소,
²병리학교실, ¹아주대학교 의과대학
비뇨기과학교실

최영득 · 안현수¹ · 조남훈²
이미경 · 강숙희² · 양원재

접수일자 : 2004년 10월 8일
채택일자 : 2004년 12월 10일

교신저자: 최영득
세브란스병원 비뇨기과
서울시 서대문구 신촌동 134
☎ 120-752
TEL: 02-2228-2317
FAX: 02-312-2538
E-mail: youngd74@yumc.
yonsei.ac.kr

서 론

방광 이행상피세포암에서 진단 시 80% 정도를 차지하는 표재성 방광암은 경요도절제술과 방광 내 항암제나 BCG (Bacillus Calmette-Guerin)를 주입하는 처치로 5년 생존율이

약 90%로 예후는 양호하나, 추적관찰 시 50-90%는 재발하고, 10-20%는 침윤성으로 진행한다. 표재성 방광암에서 재발 및 진행의 위험도가 높은 경우는 종양이 다발성이거나, 3cm 이상으로 큰 경우, 분화도가 나쁜 경우, 상피내암이 존재하는 경우 등이다. 실험적으로 재발과 진행의 위험도를 예측할 수 있는 방법으로는 유세포 측정 (flow cytometry)과

Ki67, PCNA, ras gene, p21, H-ras, K-ras, c-myc, 다양한 성장 인자, p53, Rb 등의 조직학적 발현 관찰 등이 있다. 이러한 많은 인자들이나 방법들은 대부분 저등급 표재성 방광암에 비해 고등급이거나, 침윤성 방광암에서 의미있게 발현되며, 발현 관찰 시 재발 및 진행에 관여하고 예후가 나쁜 것으로 보고되고 있다.

고등급 표재성 방광암은 경요도절제술과 방광 내 항암제나 BCG 등의 투여에도 불구하고 80% 이상에서 재발하며, 재발 시에 50% 이상이 침윤성으로 진행된다. 저등급의 표재성 방광암의 경우는 진행되거나 전이되는 경우는 적으나 50% 정도에서는 재발이 일어난다. 그러나 현재까지 연구된 방광암의 재발과 진행에 관여하리라 여겨지는 많은 인자들은 저등급 분화의 표재성 방광암에서는 발현이 적거나 없었다. 즉 저등급 표재성 방광암의 재발에 관한 기전은 알려져 있지 않다.

암의 형성이나 재발, 침윤, 전이 등은 조절되지 않는 과잉 증식, 세포의 불멸화, 염색체인자의 불안정 등에 의하여 나타나며 이들은 matrix metalloproteinase (MMP)와 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등의 이상에 관련하여 나타난다. 암의 재발과 침윤, 전이 등은 정상 세포의 기저막과 세포외 간질에 대한 암세포의 파괴능력과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.¹² 세포외 간질 단백질로는 proteoglycan, fibronectin, laminin, type IV collagen 등이 있다. 이들은 세포와 세포 사이의 유착에 관여하고, 이들 분해효소로 MMP가 중요 역할을 하며 현재 23종류가 밝혀져 있고, 외부 신호에 의해 유전자가 발현되는 유도 유전자로도 알려져 있다. 이는 조직 특이적이며 기질파괴 작용에서 세포 간에 상대적인 매개체 역할을 하고, 기저막 용해, 일차성 및 전이성 종양의 증식 및 혈관생성 관여 등으로 전이에 관여하는 것으로 알려지고 있다.¹⁴

MMP와 암과의 관계에서 MMP-1, 8, 13의 collagenase군과 MMP-2, 9의 gelatinase군, MMP-7, 11, 14 등이 연구되고 있다.¹⁹ 특히 MMP-2, 9는 기저막의 주요 구성인 type IV collagen을 분해하여 암의 침윤과 전이를 일으킨다.⁵ 방광암의 경우 MMP-2, 7, 9 등이 고등급 방광암의 침윤이나 전이에 관여한다는 보고가 있다.⁶⁻⁹ 현재까지 MMP는 기저막 용해, 일차성 및 전이성 종양의 증식 및 혈관생성 등의 기전에 관계하여 주로 방광암의 침윤 및 전이에 역할을 하는 것으로 여겨졌으나, 최근 MMP-2, TIMP-1, 2 등이 표재성 방광암의 재발과 관련이 있다는 보고가 있다.⁹⁻¹¹

따라서 본 연구에서는 저등급 표재성 방광암에서 재발의 기전을 규명하여 암세포의 초기 변화로 재발을 유도하는 전사체 발현을 조사하고자, 방광암조직에서 MMP와 일부 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등을 포함하는 cDNA

microarray를 시행하고, mRNA 발현과 단백질 발현의 변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

2000년 3월부터 표재성 방광암으로 경요도적방광종양절제술을 시행한 조직에서 재발군과 미재발군으로 분류하여 각 15명을 대상으로 하였다. 절제된 방광암 조직은 즉시 동결시킨 후 영하 80°C에서 보관하여 실험에 사용하였다. 재발군은 경요도방광종양절제술 후 6개월 이상의 추적관찰 방광경검사에서 종물이 관찰되어 조직학적으로 이행상피세포암으로 진단된 경우로 하였다. 미재발군은 최초 경요도방광종양절제술 후에 1년 이상의 추적 관찰에서 재발의 흔적이 나타나지 않는 경우로 하였다. 흉부단순촬영, 복부골반 전산화 단층촬영, 자기공명촬영, 골주사검사 등에서 침윤이나 전이가 있는 경우나 조직학적 침윤성인 경우는 제외하였다. 추적관찰은 경요도방광종양절제술로 진단 후 요점사, 요세포검사, 방광경검사를 3-6개월 간격으로 시행하였다.

대상 조직은 조직학적으로 재차 확인하여 이행상피세포암으로 저등급인 것만을 사용하였으며, 임상기록을 분석하였다. 종양의 병기 및 분화도는 UICC (Union International Contra la Cancrum) 국제기준에 따라 분류하였으며, 임상적인 인자로 성별, 연령, 조직학적 소견, 재발, 무병기간, 생존기간 등을 재발군과 미재발군에서 비교하였다.

2. 실험 방법

1) 0.12K cDNA array

(1) 0.12K cDNA array 구조; 전사체 발현을 규명하기 위하여 MMP 1, 2, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19와 TIMP1, 3의 MMP와 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등 120개의 유전자가 포함된 DNA 칩 (Digital Genomics, Seoul, Korea; <http://www.digital-Genomics.co.kr>)을 사용하였다.

(2) RNA 추출; 동결 조직에서 Ultraspec II (Biotecx Lab., Houston, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 260nm 흡광도에서 정량하였고, 일부는 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, USA)를 이용하여 'Lab On a Chip' (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, Mountain View, USA)법으로 정량 분석하여 RNA 비율이 1 이상인 mRNA만을 취하여 microarray에 사용하였다.

(3) cDNA 합성; Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하였다. 80pmol random primer 1μl, 400ng total RNA 2μl, 2.5mM dNTP mix 4μl, 증

류수 5 μ l를 넣어 섞은 후, 65°C에서 5분간 두고 얼음에 방치하였다. 여기에 5x first-strand buffer 4 μ l, 0.1M DTT 2 μ l를 넣고 42°C에서 2분간 두었다. 이후 Superscript II Reverse Transcriptase 1 μ l를 넣고 42°C에서 50분, 70°C에서 15분간 두어 cDNA를 합성하였다.

(4) **0.12K cDNA array**; cDNA microarray는 Genisphere 3DNA kit (Genisphere Inc., Hatfield, USA)를 이용하였다. 5 μ g의 total RNA를 Amino allyl cDNA labeling kit (Ambion, Austine, USA)를 사용하여 암조직은 Cy3-dUTP로, 정상 조직은 Cy5-dUTP로 표식하고, cDNA를 합성하였다. 추출한 RNA (1 μ g/1 μ l) 5 μ l에, Random Primer 2.5 μ l, Nuclease Free Water 3.5 μ l로 섞어 80°C에서 10분간 반응시키고 얼음에서 1 μ l Superscript II RNase inhibitor와 reaction mix (5x Superscript II First Strand Buffer 4 μ l, dNTP mix 1 μ l, 0.1M DTT 2 μ l, Superscript II enzyme 1 μ l)를 첨가하여 42°C에서 1.5-2시간 반응시켰다. 0.5M NaOH/50mM EDTA 3.5 μ l로 반응을 멈춘 후, 65°C에서 10분 반응시키고 1M Tris-HCl, pH 7.5 5 μ l로 중화시킨 뒤 10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA 21.5 μ l를 첨가하였다.

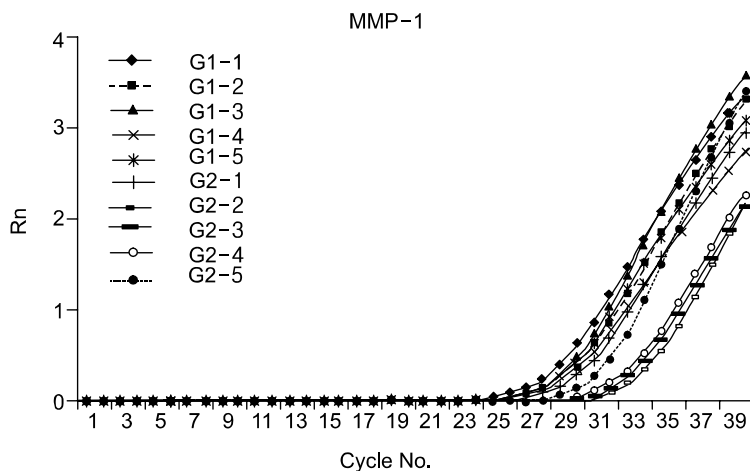
Qiagen QIAquick PCR purification kit (Qiagen GmbH, Germany)로 cDNA를 정제하고 denature된 cDNA 50 μ l, 6x

Ligation Mix (green=Cy3 or red=Cy5) 10 μ l, T4 DNA Ligase 2.5 μ l를 섞어 15-25°C에서 1.5-2시간 반응시키고, 0.5M EDTA 7 μ l로 반응을 멈춘 뒤, 65°C에서 10분간 반응시키고, 전체 부피 150 μ l가 되게 하였다.

Microconcentrators (Millipore Microcon YM-30; Millipore Corp., Bedford, USA)로 cDNA를 농축하고 농축된 cDNA가 10 μ l가 되도록 Nuclease Free Water로 맞춰준 후 65°C에서 10분간 반응 후 2x SDS-based buffer 12.5 μ l, Array 350RP DT blocker 2 μ l를 섞고, humidified chamber에 넣어 65°C에서 16시간 방치하였다.

65°C 2x SSC, 0.2% SDS로 15분, 2x SSC로 10-15분, 0.2x SSC로 10-15분간, 95% ethanol에서 2분간 수세 건조 후 2x hybridization buffer 12.5 μ l, 50-55°C에서 10분간 가온시켜 놓은 3DNA Capture Reagent 5.0 μ l, Nuclease Free water를 섞어 75-80°C에서 10분, 55-60°C에서 15-20분간 반응시켜 주고 microarray에 도말 후 coverslip을 덮었다. 60°C에서 3시간 융합반응을 시킨 후 45-50°C 2x SSC, 0.2% SDS 15분, 2x SSC 10-15분, 0.2x SSC 10-15분 수세하였다.

Scan array (Packard BioChip Technologies, Billerica, USA)를 이용하여 해독하고, Quantarray (Packard BioChip Technologies, Billerica, USA) 프로그램으로 분석하였다.



	CT*	18S mRNA	Δ CT	$\Delta\Delta$ CT	$2^{-\Delta\Delta$ CT
5	25.98	7.54	18.44	0.00	1.00
1	23.60	6.32	17.48	-0.96	1.94
2	24.84	7.05	18.36	-0.08	1.06
3	24.94	5.92	18.96	0.52	0.69
4	27.12	5.64	21.49	3.05	0.12
5	26.02	8.07	18.44	0.00	1.00
6	28.79	8.22	20.57	2.14	0.23

Fig. 1. Analysis of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Analysis of TaqMan assays to determine the optimum primer and TaqMan probe concentration. The CT values are calculated (defined as the cycle at which a statistically significant increase in Δ Rn is first detected). *: threshold cycle, Δ CT: $C_{T,X} - C_{T,R}$, $\Delta\Delta$ CT: Δ CT.q - CT.cb. Relative: $2^{-\Delta\Delta$ CT}.

2) Real-time quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction; real-time RT PCR: Liss 등¹²이 제시한 방법을 사용하여 TaqMan Mastermix (Biosystems, Forester City, USA) 10 μ l, primer 1 μ l, cDNA 2 μ l, 증류수 7 μ l를 혼합하여, ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Inc., Wellesley, USA)을 사용하여 50°C에서 2분, 95°C에서 10분, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 증폭하였다.

본 실험에 사용된 primer는 FAM이 부착되어 있으며, 모든 자료들은 3중 분석하여 최종 CT값을 산출하였고, 각 샘플에 대한 18s mRNA의 CT값으로 보정하여 분석하였다 (Fig. 1).

3) Western blot: 대상 조직을 단백질 분해 효소 억제제인 pepstatin (0.7mg/ml)이 첨가된 용해 완충액 (1M tris-Cl, 0.5M NaCl, 0.5M EDTA) 500 μ l에 넣어 4°C에 30분 반응시켜 세포를 용해시켰다. 이후 14,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 BCA법에 따라 정량하고 NuPAGE Gel (Invitrogen, Carlsbad, USA)의 lane에 20 μ g 단백질을 넣어 전기영동을 시행하고, NC membrane에 전이시켰다. 항체반응은 비특이적인 반응차단용액 (5% skim milk, 1% Tween-20 Tris-buffer saline)에서 시행하였다. 단백질이 이전된 membrane을 차단용액에 담가 상온에서 1-2시간 반응시킨 후 각각의 일차 항체를 1:200으로 희석하여 37°C에서 30분간 반응시키고 세척과정을 거친 후 이차항체를 이용하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 Chemoluminescent (ECL detection reagent, Amersham, Arlington Heights, USA)로 단백 발현을 측정하였다. 발현된 단백질의 상대적 정량을 위하여 TINA program (v 2.1)을 이용한 Densitometer (Bio-Rad, Hercules, USA)로 산출하였다.

3. 자료 분석 및 통계 방법

통계 분석으로는 비교분석을 위하여 chi-square test 및 Fisher's exact test를 사용하였다. 생존율은 Kaplan-Meier 방법을 이용하였고, 단변량 분석은 SAS Windows의 log-rank

Table 1. Clinical summary of the patients with a superficial bladder tumor

	Recurred (n=15)	No recurred (n=15)
Sex		
Male/Female	12/3	13/2
Age (mean \pm SD)(year)	68.0 \pm 4.7	54.4 \pm 10.8
Follow up		
DFT* (mean \pm SD)(month)	11.2 \pm 3.7	27.2 \pm 4.3

*: disease free time

test를 이용하였다.

결 과

1. 임상 결과

15명씩의 재발군과 미재발군의 저등급 표재성 방광 이행상피세포암환자에서 재발군의 경우 남성 12명, 여성 3명이었고, 미재발군의 경우 남성 13명, 여성 2명이었으며, 이들의 평균 연령은 재발군이 68세, 미재발군이 54.4세였다 (Table 1). 미재발군의 추적관찰기간은 평균 27.2개월 (16.8-41.6)이었으며, 재발군의 재발 기간은 평균 11.2개월 (6.0-20.6)이었다.

2. cDNA array에 의한 유전자 발현

저등급 표재성 방광암의 재발에 관여하는 전사체 발현을



Item	Recurred/Ctl	No recurred/Ctl
MMP-1	6.3528	1.333831842
MMP-2	4.4633	1.406863031
MMP-9	4.8189	1.154281897
MMP-12	4.0328	1.073182842
MMP-15	7.0309	0.562364877
TGF β 1	3.9411	0.68515266
VEGF	10.0881	1.041406594
fos	8.3395	0.913929129

Fig. 2. Image displaying 120 genes and cDNA array data of the representative superficial bladder cancer. When the cancer and normal samples are labeled with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP, respectively, the upregulated genes in the cancer samples are seen as green fluorescence (Cy-3) and downregulated genes as red fluorescence (Cy-5). The blanks filled with green color represent genes upregulated by more than 2.0 times the threshold value in the cancer. Matrix metalloproteinase (MMP)-1, 2, 9 and 12, and transforming growth factor-beta 1 (TGF β 1), fos and vascular endothelial growth factor (VEGF) are upregulated in the recurred samples compared with the non recurred samples.

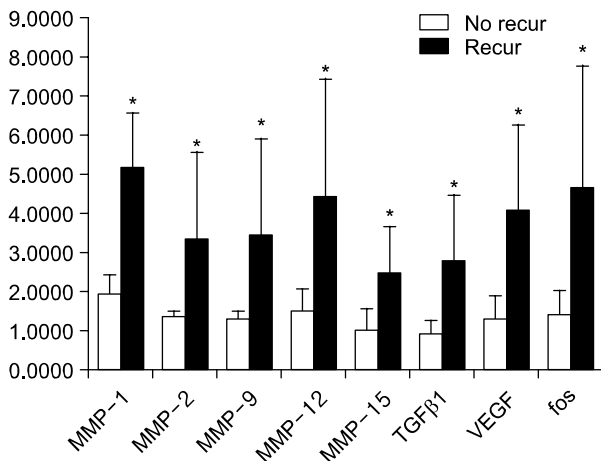


Fig. 3. Results of MMP, as quantified by a microarray. The intensity of the relative signal for each sample is calculated and presented. Expressions of MMP-1, 2, 9, 12 and 15 with TGFβ1, VEGF and fos are upregulated in the recurrent superficial low grade urothelial cancer compared with the non recurrent superficial low grade urothelial cancer. Columns and bars represent the mean and SD, respectively. *: $p < 0.05$.

규명하기 위하여 MMP 및 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등의 유전자가 포함된 DNA 칩을 사용하여 0.12K cDNA array의 분석하여 각 군의 평균값을 비교한 결과, MMP-1은 normalized ratio가 재발군에서 5.163 ± 1.374 로 미재발군의 1.993 ± 0.478 보다 의미있게 발현이 증가되어 있었고, MMP-2, 9, 12, 15 및 TGFβ1, VEGF, fos의 발현도 미재발군에 비해 재발군에서 의미있게 증가하였다 (Fig. 2, 3).

3. Real-time RT PCR를 이용한 유전자 발현

저등급 표재성 방광암의 재발에 관여하는 인자를 규명하기 위하여 0.12K cDNA array에서 발현이 재발군에서 의미있게 증가가 보이는 인자 MMP-1, 2, 9, 12, 15 및 TGFβ1, VEGF, fos에 대해 real-time RT PCR을 시행하여, 18s mRNA에 대한 상대적인 비율을 측정하여 각 군의 평균값을 비교한 결과 MMP-1은 $\Delta\Delta CT$ 값이 재발군에서 0.971 ± 0.473 으로 미재발군의 0.181 ± 0.008 보다 의미있게 높아 mRNA의 발현이 증가되어 있었고, MMP-12, TGFβ1, VEGF 및 fos의 5개 인자에서도 미재발군에 비해 재발군에서 의미있게 높았다 (Fig. 4, 5). 한편 MMP-2의 $\Delta\Delta CT$ 값이 재발군에서 0.219 ± 0.436 으로 미재발군의 0.007 ± 0.008 과 비교하여 비율이 증가하였으나, 의미있는 차이를 보이지 않았고, MMP-9, 15의 경우도 18s mRNA에 대한 상대적인 비율이 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 5).

4. Western blot 결과

저등급 표재성 방광암의 재발에 관여하는 인자를 규명하기 위하여 Real-time RT PCR에서 재발군에서 증가 발현을 보이는 MMP-1, 12, TGFβ1, VEGF 및 fos 단백질의 발현을 관찰하여 배경농도를 보정하여 각 군의 평균값을 비교한 결과, MMP-1의 경우 재발군에서 34.871 ± 4.688 로 미재발군의 30.841 ± 2.192 보다 의미있게 높아 단백 발현이 증가되어 있었고, MMP-12, TGFβ1, VEGF 및 fos도 단백 발현이 의미있게 높아, 5개 인자가 Western blot에서도 발현이 의미있게 증가되었다 (Fig. 6, 7).

고 찰

MMP는 일반적으로 암세포에서 발현이 증가되는데 특히 암과 정상 조직과의 경계 부위에서 많이 발현되며,² 암의 전이와 관련하여 초기에는 기저막 용해 등 삼출에 관여하고,³ 최근에는 일차성 및 전이성 종양의 증식 및 혈관생성에 직접 관여하여 전이에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.⁴ MMP는 유방암,^{5,13} 대장암,¹⁴ 난소암,¹⁵ 전립선암,¹⁶ 방광암¹⁶⁻¹⁹ 등에서 연구되고 있으며, 주로 고병기의 진행된 암에서 발현이 증가되어 있는 것으로 보고가 되고 있다.

방광암과 MMP에 대한 연구로 MMP-1, 2, 7, 9의 경우 고등급, 고병기 방광암에서 발현이 증가됨이 보고되고 있다.^{16,18,19} MMP-2, 9는 고등급, 고병기를 보이는 방광암 환자의 소변에서 증가한다고 보고되어 추후 예후를 예측할 수 있는 척도로 제시되기도 한다.⁸ 방광암의 재발과 MMP와의 관계에 대한 연구로 MMP-2와 9는 고등급, 고병기의 방광암에서 발현이 의미있게 증가되나 표재성 방광암의 재발이나 침윤과는 연관성이 없다는 보고가 있고,¹⁰ 반면, Hara 등⁹은 표재성 방광암에서도 재발된 군이 재발하지 않은 군에 비하여 MMP-9와 TIMP-2의 발현이 증가되어 있음을 보고하여 표재성 방광암의 재발에 MMP-9와 TIMP-2가 어떠한 기능을 할 것으로 생각된다고 하였으나 이것은 고등급암에 국한된 보고였다. 이상의 연구 결과를 종합하면 MMP-1, 2, 7 및 9 등이 방광암에 관련하여 발현되나 고등급, 고병기와 연관되어 있다. 즉, 저등급 표재성 방광암의 재발이나 진행에 관한 MMP의 역할이 없거나 연구가 미비하다.

본 연구에서 저등급 표재성 방광암 조직에서 MMP에 대하여 0.12K cDNA array를 시행한 결과 미재발군에 비해 재발군에서 MMP-1, 2, 9, 12 및 15 등이 높게 발현되었다. 동시에 이들에서 real-time RT PCR로 mRNA 발현변화와 Western blot를 이용하여 단백발현의 변화를 관찰한 결과 MMP-2, 9는 재발군과 미재발군 사이에 의미있는 차이를 보이지

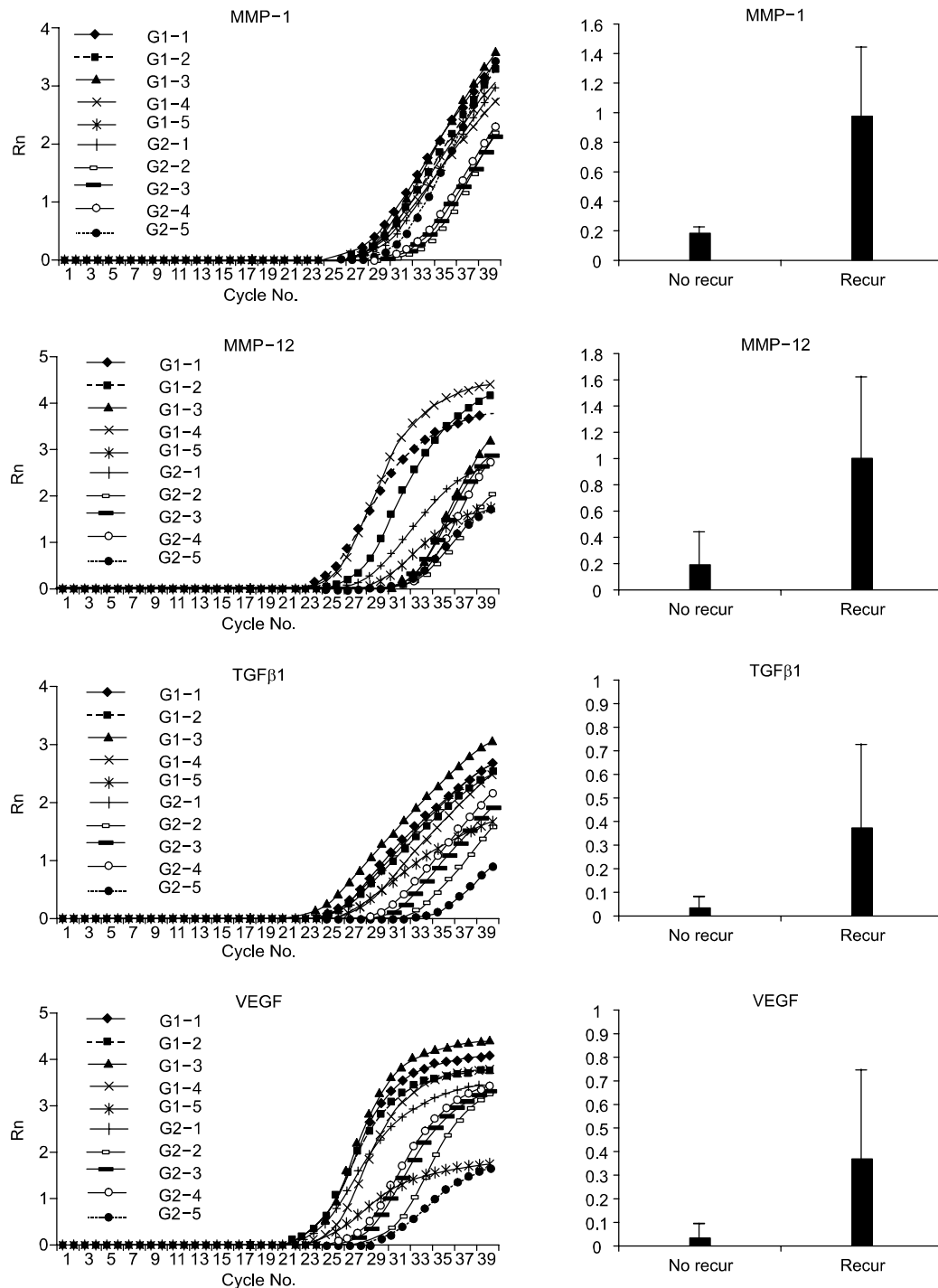


Fig. 4. Representative results of the real-time RT-PCR of MMP-1, MMP-12, TGFβ1, and VEGF. Results of the TaqMan assays for the determination of the optimum primer and TaqMan probe concentrations. Normalized fluorescence values (ΔRn) are on the X-axis. Amplification plots for the RT-PCR of MMP-1, MMP-12, TGFβ1 and VEGF are shown as calibration curves, which depict the normalized fluorescence values (ΔRn) plotted against the number of amplification cycles. Lanes G2 (1-5) show a tendency toward higher CT and lower ΔRn than lanes G1 (1-5) (lanes G1, recurred samples; lanes G2, non recurred samples). Columns & bars represent the mean and SD of $2^{-\Delta\Delta CT}$, respectively.

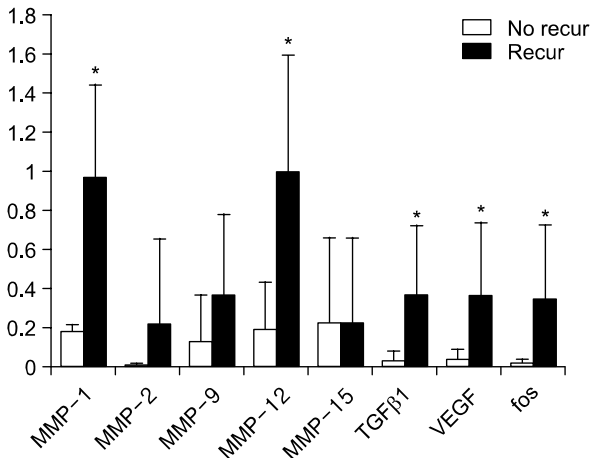


Fig. 5. Results of real-time RT-PCR. The transcripts of MMP-1 and 12, and TGFβ1, VEGF and fos are significantly overexpressed in the recurrent samples compared to the non recurrent samples. The expressions of MMP-2, 9 and 15 are overexpressed, but these are not statistically significant. Columns and bars represent the mean and SD of $2^{-\Delta\Delta CT}$, respectively. *: $p < 0.05$.

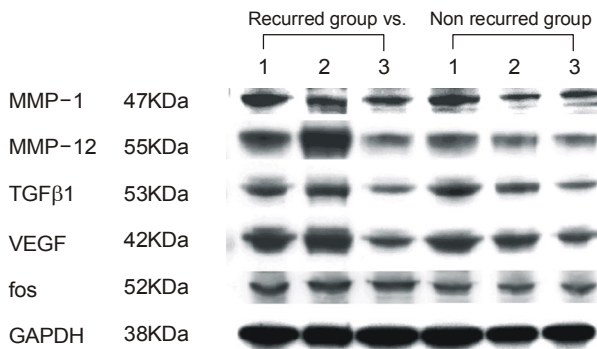


Fig. 6. Results of Western blot. Note the upregulated expressions of MMP-1, MMP-12, TGFβ1, VEGF and fos in the recurrent samples vs. the non recurrent samples.

않았다. 그러나 MMP-1 및 MMP-12는 재발군에서 의미있는 증가를 보여 저등급 표재성 방광암의 재발에 관여함을 알 수 있다.

MMP-1은 interstitial collagenase로, 원섬유성 교원질 I, II, III, 및 X형에 작용한다. MMP-1은 유방 종양,²⁰ 대장암²¹에서 발현이 증가되고, 구강 내 편평상피암²²에서 림프절 전이의 지표가 될 수 있다고 보고되고 있다. 방광암에서는 저병기, 저등급 방광암에 비하여 고병기, 고등급의 경우에 많이 발현되는 것으로 보고되고 있다.¹⁷ MMP-12는 macrophage elastase로, 주로 큰 대식세포에서 분비되어 탄력소를 분해하는 작용을 가지고 있다. 피부암에서 MMP-12의 mRNA 및 단백 발현이 되나, 전암성 병변에서 발현되지 않아 역분화와 관

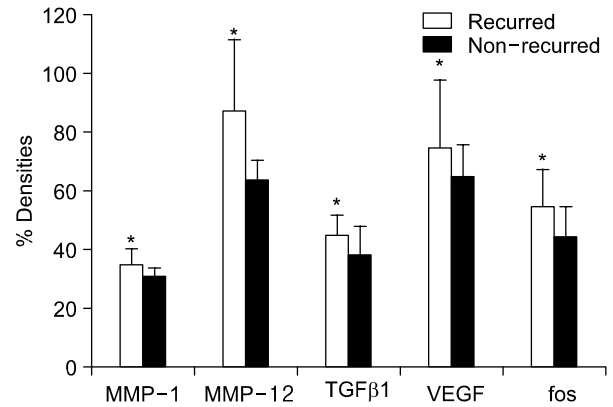


Fig. 7. Graphic illustrating the comparative densitometric data for the Western blot analysis, detected with antibodies to MMP-1 and 12, and TGFβ1, VEGF and fos. Comparative bands show the mean±SD determined by densitometry, *: $p < 0.05$.

련 있을 것이라고 제시된 바 있고,²³ 여성외음부 편평상피암에서 MMP-12 발현은 종양의 침습도와 연관이 있으나, 한편 큰 대식세포에서 발현되는 MMP-12는 좋은 예후와 관련이 있다는 보고가 있다.²⁴ 또한, MMP-12는 간세포암에서 VEGF와 연관되어 혈관형성과 관련이 있다는 보고가 있고,⁴ 일부 실험에서는 MMP-12가 혈관생성을 억제시킨다고 보고되었다.²⁵

MMP는 여러 가지 자극에 의하여 활성화될 수 있는데, MMP 활성화에 fos 등의 종양유전자들이 관여될 수 있다. 또한 MMP의 발현은 interleukins, interferons, VEGF, TGFβ, EGF, KGF, NGF, βFGF, PDGF와 TNF 등의 growth factor와 사이토카인의 조절을 받게 된다.

본 연구에서도 저등급 표재성 방광암의 재발에서 MMP-1, 12 외에 0.12K cDNA array에서 TGFβ1, VEGF, fos 등의 발현증가가 관찰되었으며, real-time RT-PCR로 mRNA 발현 변화와 Western blot를 이용하여 단백발현의 변화를 관찰한 결과 TGFβ1, VEGF, fos 등이 재발된 군에서 발현이 의미있게 증가되었다. 따라서 저등급 표재성 방광암의 재발에 MMP-1 및 12 외에 TGFβ1, VEGF, fos가 관여함을 알 수 있었다.

MMP의 활성화에 영향을 미치는 인자들에 대해 종양의 발생과 진행에 관하여 보고된 바를 살펴보면, fos는 발암유전자로 암발생 과정의 초기 단계에서 중요한 역할을 하여 MMP-1을 활성화시킨다는 보고가 있다.^{1,26} MMP-1은 MMP-2에 대한 효과적인 활성화 물질로 작용할 수 있으며 암세포의 감수성을 증가시키고,^{1,27} MMP-9는 배양세포에서 VEGF를 유리시킨다는 보고가 있으며,²⁹ MMP-9가 VEGF 유리에 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다. TGFβ1은 MMP-1의 전

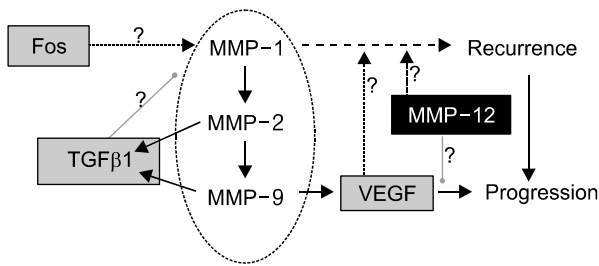


Fig. 8. MMP regulation in superficial low grade urothelial bladder cancer.

사를 일부 억제하고, MMP-2와 MMP-9를 활성화시킨다는 보고가 있다.^{29,30}

이상의 보고들을 토대로 저등급 표재성 방광암의 재발에서 MMP-1, 12, fos, TGFβ1, VEGF 등과의 관계를 도식적으로 유추해보면 (Fig. 8), 증가된 초기 fos는 MMP-1의 발현에 작용하고 MMP-1에 의하여 MMP-2, 9의 활성화가 이루어져 VEGF의 발현이 증가되나 이러한 VEGF의 작용은 MMP-12에 의하여 억제당하여 진행이나 전이가 약화되는 것으로 여겨진다. 한편 활성화된 MMP-2, 9에 의해 TGFβ1 발현이 증가되고 이에 의해 MMP-1의 작용 억제로 재차 MMP-2, 9의 조절이 억제되어 MMP-2, 9의 암의 진행기전이 약화되는 것으로 유추된다. 즉 fos에 의해 유도된 MMP-1과 이후의 MMP-2, 9, VEGF, TGFβ1들은 서로 보완적으로 작용하며, MMP-12에 의해 암의 진행기전이 억제당하여 재발이 이루어지는 것으로 유추할 수 있다.

결론

진행이나 전이되는 경우는 적으나 재발이 잦은 저등급 표재성 방광암에서 초기의 변화로 재발을 유도하는 전사체 발현을 규명하고자 저등급 표재성 방광암에서 MMP와 일부 종양유전자, 세포주기 조절유전자 등을 포함하는 0.12K cDNA array를 시행하고 mRNA 발현과 단백발현의 변화를 관찰한 결과, 재발군에서 미재발군에 비하여 MMP-1, 12, TGFβ1, VEGF와 fos의 발현이 의미있게 증가하여, 이는 저등급 표재성 방광암의 재발과 연관이 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 2000;36:1621-30
- Murray GI. Matrix metalloproteinases: a multifunctional group

of molecules. *J Pathol* 2001;195:135-7

- Moses MA. The regulation of neovascularization by matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 1997;15:180-9
- Kim S, Park HS, Son HJ, Moon WS. The role of angiostatin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and 12 in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* 2004;10:62-72
- Moon A, Kim MS, Kim TG, Kim SH, Kim HE, Chen YQ, et al. H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras induced invasive phenotype. *Int J Cancer* 2000;85:176-81
- Durkan GC, Nutt JE, Rajjayabun PH, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in voided urine samples from patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2001;7:3450-6
- Gakiopoulou H, Nakopoulou L, Siatelis A, Mavrommatis I, Panayotopoulou EG, Tsimpa I, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 as a multifunctional molecule of which the expression is associated with adverse prognosis of patients with urothelial bladder carcinomas. *Clin Cancer Res* 2003;9:5573-81
- Gerhards S, Jung K, Koenig F, Danilchenko D, Hauptmann S, Schnorr D, et al. Excretion of matrix metalloproteinases 2 and 9 in urine is associated with a high stage and grade of bladder carcinoma. *Urology* 2001;57:675-9
- Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S, Kamidimo S. Significance of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases expression in the recurrence of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 2001;165:1769-72
- Papathoma AS, Petraki C, Grigorakis A, Papakonstantinou H, Karavana V, Stefanakis S, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer. *Anticancer Res* 2000;20:2009-13
- Durkan GC, Nutt JE, Marsh C, Rajjayabun PH, Robinson MC, Neal DE, et al. Alteration in urinary matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio predicts recurrence in nonmuscle-invasive bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2576-82
- Liss B, Franz O, Sewing S, Bruns R, Neuhoff H, Roeper J. Tuning pacemaker frequency of individual dopaminergic neurons by Kv4.3L and KChip3.1 transcription. *EMBO J* 2001;20:5715-24
- La Rocca G, Pucci-Minafra I, Marrazzo A, Taormina P, Minafra S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br J Cancer* 2004;90:1414-21
- Papadopoulos S, Scorilas A, Arnogianaki N, Papapanayiotou B, Tzimogiani A, Agnantis N, et al. Expression of gelatinase-A (MMP-2) in human colon cancer and normal colon mucosa.

- Tumour Biol 2001;22:383-9
15. Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, Raggi A, Amberger A, Margreiter R, et al. Cytokine-regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2003;39:2499-505
16. Trudel D, Fradet Y, Meyer F, Harel F, Tetu B. Significance of MMP-2 expression in prostate cancer: an immunohistochemical study. *Cancer Res* 2003;63:8511-5
17. Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Zervas A, Giannopoulou I, Constantinides C, Lazaris AC, et al. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2001;9:130-7
18. Sumi T, Yoshida H, Hyun Y, Yasui T, Matsumoto Y, Hattori K, et al. Expression of matrix metalloproteinases in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Oncol Rep* 2003;10:345-9
19. Xu K, Hou S, Du Z. Prognostic value of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in bladder carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:743-5
20. Fuchs B, Inwards CY, Janknecht R. Upregulation of the matrix metalloproteinase-1 gene by the Ewing's sarcoma associated EWS-ER81 and EWS-Fli-1 oncoproteins, c-Jun and p300. *FEBS Lett* 2003;553:104-8
21. Behrens P, Mathiak M, Mangold E, Kirdorf S, Wellmann A, Fogt F, et al. Stromal expression of invasion-promoting, matrix-degrading proteases MMP-1 and -9 and the Ets 1 transcription factor in HNPCC carcinomas and sporadic colorectal cancers. *Int J Cancer* 2003;107:183-8
22. Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;106:683-9
23. Kerkela E, Ala-Aho R, Jeskanen L, Rechardt O, Grenman R, Shapiro SD, et al. Expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) by tumor cells in skin cancer. *J Invest Dermatol* 2000;114:1113-9
24. Kerkela E, Ala-aho R, Klemi P, Grenman S, Shapiro SD, Kahari VM, et al. Metalloelastase (MMP-12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome. *J Pathol* 2002;198:258-69
25. Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK, et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol* 1998;161:6845-52
26. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993;53:288-95
27. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-60
28. Owen JL, Iragavarapu-Charyulu V, Gunja-Smith Z, Herbert LM, Grosso JF, Lopez DM. Up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in T lymphocytes of mammary tumor bearers: role of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 2003;171:4340-51
29. Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G. Transforming growth factor beta1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:27-34
30. Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000;14:163-76